

# 계지가부자탕(桂枝加附子湯)이 MIA로 유도된 골관절염 Rat 모델에 미치는 영향

원제훈 · 우창훈

대구한의대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

## Effects of *Gyejigabuja-tang* on MIA-induced Osteoarthritis in Rats

Je-Hoon Won, K.M.D., Chang-Hoon Woo, K.M.D.

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

RECEIVED March 17, 2015

ACCEPTED March 28, 2015

### CORRESPONDING TO

Chang-Hoon Woo, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Pohang Korean Medical Hospital, 907-8, Daejam-dong, Nam-gu, Pohang 790-826, Korea

TEL (054) 281-7901

FAX (054) 281-7463

E-mail jungwsungw@hanmail.net

Copyright © 2015 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** This study was carried out to investigate the effects of *Gyejigabuja-tang* extracts on the Monosodium iodoacetate (MIA) induced osteoarthritis in rats.

**Methods** Osteoarthritis was induced by injection of MIA into knee joint cavity of rats. Rats are divided into 4 groups (normal, control, positive comparison group, GBT group, each n=5). Normal group was injected by normal saline into knee joint cavity only. Control group was induced for osteoarthritis by MIA and oral medicated with distilled water. Positive comparison group was injected with MIA and taken Joins tablet 25 mg/kg. GBT group was injected with MIA and taken *Gyejigabuja-tang* extracts 300 mg/kg. Positive comparison group and GBT group were oral medicated for each substance once a day for 4 weeks. ALT, AST and creatinine were evaluated for hepatotoxicity and nephrotoxicity. Hind paw weight bearing ability was examined and inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, osteocalcin and deoxyypyridinoline (DPD) within serum were analysed. Knee joint structures were observed by Hematoxylin & Eosin (H&E), Safranin-O staining method.

**Results** 1. Function of liver and kidney was not affected. 2. Hind paw weight bearing ability was significantly improved. 3. IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in experimental group were significantly decreased compared with control group. 4. PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin and DPD in experimental group were decreased compared with control group. 5. In histopathologic observation, injury on synovial membrane and cartilage of experimental group was lesser than control group (H&E, Safranin-O staining).

**Conclusions** Based on these results, it can be suggested that *Gyejigabuja-tang* has anti-inflammation effects on the MIA-induced osteoarthritis in rats. (**J Korean Med Rehab 2015;25(2):51-64**)

**Key words** *Gyejigabuja-tang*, Osteoarthritis, Anti-inflammation effect, Monosodium iodoacetate (MIA)

## 서론»»»»

골관절염은 성인에게 발생하는 가장 흔한 관절 질환 중 하나로 주로 체중이 부하되는 관절을 침범하는데, 관

절 연골의 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형 등을 특징으로 하며 반복적인 동통, 관절 강직감 및 점진적인 운동장애 등을 초래한다<sup>1)</sup>.

골관절염은 65세 이상의 노년층에서 60% 이상의 유병률을 보이며, 그 비율이 점점 증가하는 추세이다<sup>2)</sup>. 정확한 원인과 발생 기전은 알려지지 않았으나 노화로 인한 관절의 마모가 원인이 되고 다양한 생물학적 인자와 기계적인 요인이 복합적으로 작용하여 골관절염으로 진행하는 것으로 인식되고 있다<sup>3)</sup>. 골관절염의 치료는 연골의 변성을 유발하는 요인을 최대한 억제하여 통증을 경감시키고 관절의 기능을 유지하고 변형을 방지하는데 그 목표를 두고 있다<sup>2)</sup>.

골관절염은 관절의 통증과 굴신불리 등을 주된 증상으로 하여 한의학에서 痺證의 범주에 속한다. 痺는 閉의 뜻으로 營衛失調, 腠理空疎, 正氣虛弱한 상태에서 風寒濕熱의 邪氣가 체내에 침입하여 관절에 응체됨으로써 발생한다. 골관절염은 만성질환으로 虛寒한 경우가 많으므로 溫補하는 동시에 氣血이 不通하여 나타나는 통증을 宣通하는 치법을 사용한다<sup>1)</sup>.

MIA 유도 골관절염 동물 모델은 연골의 손상과 기능장애, 통증 등의 양상이 실제 질환과 유사하여<sup>4)</sup> 골관절염의 한방치료 연구에 활발히 이용되고 있는데, 최근 健步丹<sup>5)</sup>, 防己黃芪湯<sup>6)</sup>, 桂枝人蔘湯<sup>7)</sup>, 疎風活血湯<sup>8)</sup> 등의 한약이 MIA 유도 골관절염 Rat에 미치는 영향에 대한 연구들이 보고되었다.

桂枝加附子湯은 「傷寒論」의 처방으로, 太陽病에 發汗過多로 陽虛液脫하여 소변이 곤란하고 四肢痛이 있어 屈伸이 되지 않는 환자에게 사용한다고 기록되어 있다<sup>9)</sup>. 桂枝加附子湯의 연구로는 김 등<sup>10)</sup>의 양측난소절제술 후 발생한 갱년기증후군 환자 치험례와 방<sup>11)</sup>의 문헌적 고찰 연구 등이 보고되었고, 실험동물에서 桂枝加附子湯 전탕액의 鎮痛, 鎮痙 효과에 대한 연구<sup>12)</sup>는 있었지만 桂枝加附子湯이 골관절염에 미치는 영향에 대한 연구는 접하지 못했다.

본 연구에서는 桂枝加附子湯이 골관절염 치료에 어떤 유의한 효과를 나타내는지 알아보기 위해 MIA로 골관절염을 유발시킨 Rat에 桂枝加附子湯을 투여하고 뒷다리 체중 부하 검사, 혈액학적 분석, 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정, 병리조직학적 검사를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 桂枝加附子湯은 「新古方撰次」<sup>9)</sup>에 의거하여 처방하였다. 약재는 음니허브(대구, 한국)에서 구입하여 정선 후 사용하였고, 그 구성과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table I).

#### 2) 동물

수컷 7주령의 SD Rat (175~200 g)는 샘타코바이오코리아 Co.(오산, 한국)에서 공급받았고, 동물은 실험 당일까지 고형사료(삼양사료 Co., 한국)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12시간 light-dark cycle의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구는 ○○대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실시하였다(승인번호: DJUAR2014-010).

#### 3) 시약

본 실험에서는 Diethyl pyrocarbonate, Chloroform, Trichloroacetic acid, Isopropanol, Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, D-PBS, 2-Isopropanol, MIA는 Sigma Co. (USA) 제품을 사용하였으며, FBS는 Life Technologies Co. (USA) 제품을 사용하였다. IL-1β, IL-6, TNF-α의 ELISA kit는 R&D system (USA) 제품을 사용하였고 PGE<sub>2</sub> ELISA kit는 Cayman (514010, USA) 제품을, LTB<sub>4</sub> ELISA kit는 Cayman (520111, USA) 제품을 사용하였다. Osteocalcin ELISA kit는 TaKaRa 사(MK147, Japan) 제품을, DPD ELISA kit는 Kamiya biomedical (KT-59767, USA) 제품을 사용하였다. H&E 염색과 Safranin-O 염색에는 Hematoxylin (Merck Co.,

**Table I.** The Prescription of *Gyejigabuja-tang*

Herb name	Pharmacognostic nomenclature	Dose (g)
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	6.0
芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6.0
附子	<i>Aconiti Lateralis Preparata Radix</i>	2.0
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	6.0
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	6.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
Total		30.0

Germany), Eosin (Wako Co., Japan), Safranin-O (Merck Co., Germany)을 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 4) 기기

본 실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (Forma Scientific Co., USA), Clean Bench (Vision Scientific Co., 한국), Autoclave (Sanyo, Japan), Micro-pipet (Gilson, France), Water Bath (Vision Scientific Co., 한국), Vortex Mixer (Vision scientific Co., 한국), Centrifuge (Sigma Co., USA), Spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Deep-Freezer (Sanyo, Japan), Ice-maker (Vision Scientific Co., Korea), Homogenizer (OMNI, USA), Plateshaker (Lab-Line, USA), Incapacitance Analgesia Meter (IITC Inc., USA) 및 ELISA Reader (Molecular Devices, USA)를 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료 추출

桂枝加附子湯 2첩 분량(60 g)에 증류수 2000 ml를 가하여 열탕 추출기(DWT-1800T, 대웅, 한국)에서 2시간 추출하여 얻은 탕전액을 흡입 여과하고 감압 증류장치(B-480, Buchi, Switzerland)로 농축한 후 이를 다시 동결 건조기(FDU-540, Eyela, Japan)를 이용하여 완전 건조한 桂枝加附子湯 추출물 9.5 g (수율 15.83%)을 냉동 보관(-84°C)하면서 경구 투여에 적당한 농도로(300 mg/kg) 희석하여 사용하였다.

### 2) 실험군 분류

실험군은 정상군(Normal), 대조군(Control), 양성대조군(JOINS), 실험군(GBT) 등 총 네 군으로 분류하였으며, 각 군당 동물 수는 5마리로 하였다. 정상군은 골관절염을 유발하지 않고 아무런 처치 없이 자유식이 하였다. 양성대조군은 조인스정(J200, SK케미칼, 한국) 25 mg/kg을, 실험군은 桂枝加附子湯 300 mg/kg을 2 ml의 0.5% CMC (Sigma, USA) 용액에 녹여서 투여하였고, 대조군은 0.5% CMC 용액을 동량 투여하였다. 약물 투여는 1일 1회 매일 오전 11시에 금속제 존대를 이용하여 위 내로 강제 경구 투여하였다.

### 3) 관절염 유발

약물 투여를 시작한지 1주 지난 시점에 식품의약품안전처의 생약(한약)제제의 효력시험 가이드라인<sup>13)</sup>에 근거하여 MIA를 주입, 골관절염을 유발하였다.

Ketamine (SH35361504, 유한양행, 한국) 0.5 ml와 Rompun (41882, BAYER Co., 한국) 0.2 ml를 혼합하여 Rat의 복강에 주사하여 마취시킨 후 Rat의 왼쪽 무릎 주변을 깨끗이 제모하고 골관절염 유발물질인 MIA를 0.3 ml 주사기(BD 31G Ultra-Fine™ II, Medical-Diabetes Care, USA)를 사용하여 0.9% saline으로 희석하여 무릎 관절강 내에 50 μl (60 mg/ml)씩 투여하였다.

### 4) 체중 변화 및 식이효율 측정

체중은 1주일마다 오전 10시 일정한 시간에 동물용 체중계(카스전자저울, 한국)로 측정하였고 동일한 시간에 식이 섭취량도 측정하였다. 식이 효율(Feeding efficiency ratio, FER)은 식이 섭취량에 대한 체중 증가량의 비율로서 다음 식에 따라 계산하였다.

$$FER(\%) = \frac{\text{총 체중 증가량}}{\text{총 식이 섭취량}} \times 100$$

### 5) 뒷다리 체중 부하 측정

뒷다리 체중 부하는 골관절염을 유발한 후 0, 7, 14, 21일 째 되는 날에 Incapacitance tester (Ser. No. 01/45/25, Linton Instrument Co., UK)를 이용하여 측정하였다. 플라스틱 방을 60도 각도의 기울기로 세운 후 Rat의 배가 기기의 센서에 닿지 않은 상태에서 양 하지의 무게를 각각 측정하였다. 관절염이 유발된 뒷다리의 무게에 대한 정상 뒷다리의 무게의 비를 측정하여 체중부하값을 구하고 각 군마다 평균값을 계산한 후에 이 평균값을 정상군과 비교하여 상대적 통증 비율(%)로 나타내었다.

$$\text{체중부하값} = \frac{\text{정상 뒷다리의 무게}}{\text{관절염이 유발된 뒷다리의 무게}}$$

$$\text{상대적 통증 비율}(\%) = \left( \frac{\text{각 군의 체중부하 평균값}}{\text{정상군의 체중부하 평균값}} \right) \times 100$$

### 6) 혈액 분석

최종 실험 종료 후 모든 동물은 12시간 절식 후 에틸

에테르(덱산제약, 한국)로 마취하고 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈관을 이용하여 심장천자법으로 채혈하였다. 채혈한 혈액은 혈청 분리용 튜브에 담아 20분간 3000 rpm으로 원심분리한 후 혈청을 얻어 간과 신장 독성을 확인하기 위한 생화학적 지표 분석을 위한 시료로 이용하였다. 분리한 혈청에서 간 기능의 지표인 ALT 및 AST를, 신장 기능의 지표인 Creatinine의 수준을 생화학 자동분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 7) 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정

채혈한 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 염증 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )의 생성량을 측정하였다. Rat용 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ELISA kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각각 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  코팅 anti-body를 microwell에 100  $\mu$ l씩 분주하고 4°C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200  $\mu$ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100  $\mu$ l씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100  $\mu$ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50  $\mu$ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 측정하였다.

또한 염증 매개인자 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin, DPD의 생성량을 ELISA법으로 측정하였다. 각 염증 매개인자들은 각각의 ELISA assay kit를 이용하여 제조사의 지시에 따라 코팅된 96 well plates에 100  $\mu$ l씩 각각 혈청을 분주하고 실온에서 16시간 방치하였다. 상기 plate를 0.05%의 트윈(tween)이 포함된 D-PBS로 3회 이상 세척하고, 1%의 BSA를 함유한 D-PBS로 차단하였고, 실온에서 2시간 방치하였다. 다시 각 well을 세척한 후 2차 항체 바이오틴(biotin)이 결합된 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin, DPD를 첨가하고 실온에서 2시간 방치하였다. 이어서 각 well을 다시 트윈이 포함된 D-PBS로 세척하고, 아비딘(avidine)이 부착된 과산화효소를 첨가하여 실온에서 30분간 방치

하였다. 마지막으로 well을 트윈이 포함된 D-PBS로 세척한 다음 ABTS 기질을 첨가하고 ELISA reader로 405 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

### 8) 병리조직학적 검사

실험 종료 후 무릎 부위를 절단하여 10% EDTA가 포함된 10% chloro-form 용액에 넣어 관절 조직을 탈칼슘화(decalcification)시켰다. 방사선 촬영기법(radiographic technique)을 이용하여 탈칼슘화 유무를 확인한 후 파라핀 왁스에 관절 조직을 넣고 고정된 다음 관상면으로 절단하였다. 조직을 7  $\mu$ m의 크기로 자른 뒤, H&E 및 Safranin-O 염색을 실시하여 조직의 상태를 관찰하였다. 조직은 light microscope를 이용하여 1 $\times$ 100의 배율로 관찰하였다. 염증 반응 발생 유무나 활막 세포의 증식, 염증 세포의 조직 침윤 여부는 H&E 염색 결과에서 확인하였으며, proteoglycan 층을 염색하는 Safranin-O 염색 결과에서는 연골 조직의 손상 여부를 확인하였다.

## 3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0 for Windows를 사용하여 통계 처리 하였다. 통계적 유의성은 unpaired student's t-test를 이용하여 검정하였고 p<0.05인 것을 유의성이 있다고 판정하였다. 모든 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표기하였다.

## 결과»»»»

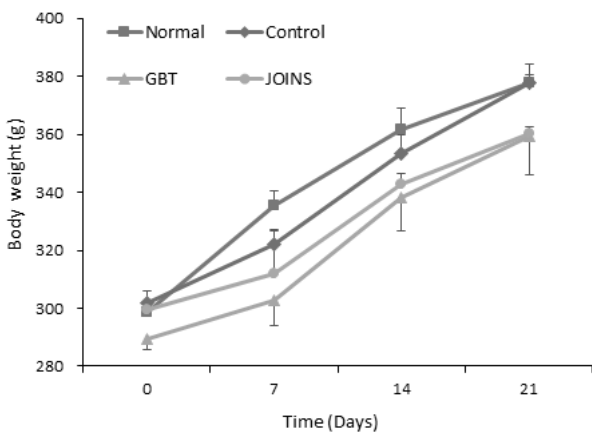
### 1. 체중 변화 및 식이효율

실험이 진행되는 동안 실험동물의 체중 변화를 측정하고 결과, 모든 군에서 체중이 꾸준히 증가하였으며 유의성 있는 체중 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 1).

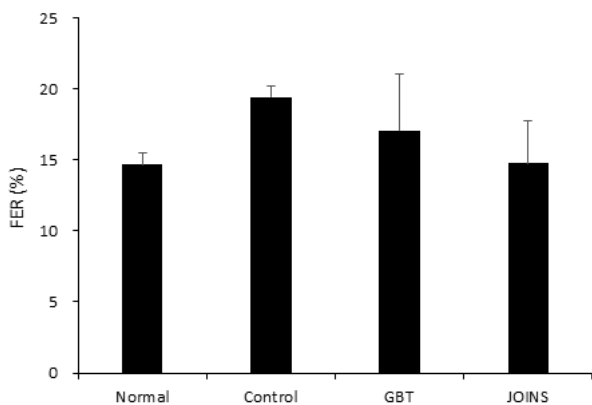
실험 종료 시 식이섭취량과 체중증가량을 이용하여 각 군의 식이효율을 구한 결과, 정상군이 14.67 $\pm$ 0.81%, 대조군이 19.4 $\pm$ 0.80%, GBT 투여군이 17.05 $\pm$ 3.95%, 조인스정 투여군이 14.75 $\pm$ 2.96%로 나타났다. GBT 투여군과 조인스정 투여군이 대조군에 비해 식이효율이 감소되었지만 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

## 2. 뒷다리 체중 부하에 미치는 영향

뒷다리 체중 부하를 측정하여 시간에 따른 상대적 통증 비율(%)을 확인한 결과, 21일 째의 상대적 통증 비율은 대조군이  $236.0 \pm 56.9\%$ , GBT 투여군이  $114.3 \pm 12.3\%$ , 조인스정 투여군이  $120.5 \pm 8.2\%$ 로 나타났다. GBT 투여군과 조인스정 투여군은 대조군에 비해 통증이 현저하게 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).



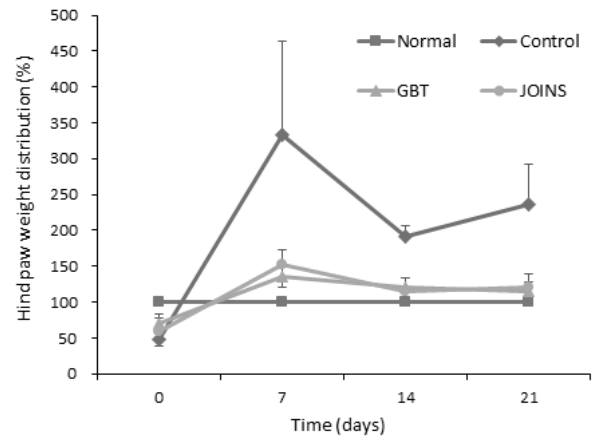
**Fig. 1.** Change of body weight of MIA-induced osteoarthritis rats, Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means  $\pm$  S.D.



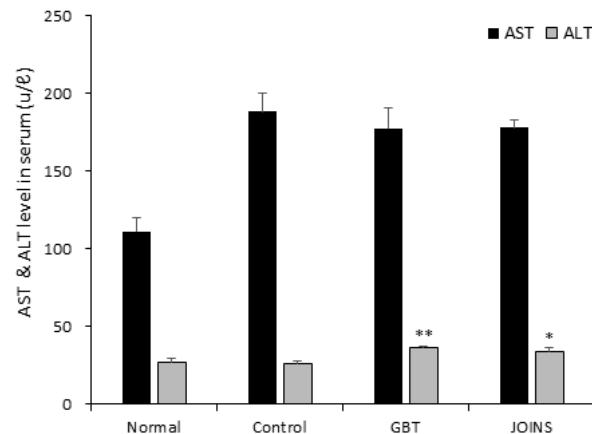
**Fig. 2.** Food efficiency ratio of MIA-induced osteoarthritis rats, Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means  $\pm$  S.D.

## 3. 간 기능에 미치는 영향

AST는 정상군이  $111.2 \pm 8.7$  U/L, 대조군이  $188.0 \pm 12.2$  U/L, GBT 투여군이  $177.4 \pm 13.1$  U/L, 조인스정 투여군이  $177.8 \pm 5.1$  U/L로 나타났다. GBT 투여군과 조인스정 투여군은 대조군에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4).



**Fig. 3.** Change of joint pain of MIA-induced osteoarthritis rats, Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means  $\pm$  S.D.



**Fig. 4.** Effects of GBT on the ALT, AST in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats, Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Statistically significant value compared with control by t-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

ALT는 정상군이  $27.0 \pm 2.1$  U/L, 대조군이  $25.8 \pm 2.4$  U/L, GBT 투여군이  $36.2 \pm 1.2$  U/L, 조인스정 투여군이  $33.4 \pm 3.1$  U/L로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 증가하였고, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 증가하였다(Fig. 4).

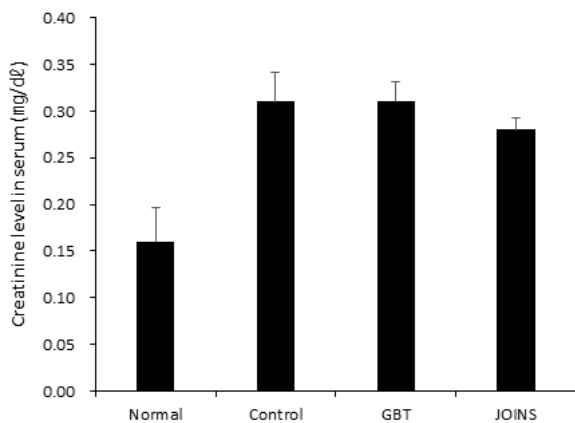
#### 4. 신장 기능에 미치는 영향

Creatinine은 정상군이  $0.16 \pm 0.036$  mg/dl, 대조군이  $0.31 \pm 0.031$  mg/dl, GBT 투여군이  $0.31 \pm 0.021$  mg/dl, 조인스정 투여군이  $0.280 \pm 0.013$  mg/dl로 나타났다. GBT 투여군과 조인스정 투여군은 대조군에 비해 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 5).

#### 5. 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자에 미치는 영향

##### 1) IL-1 $\beta$

혈청 내 IL-1 $\beta$ 는 정상군이  $49.2 \pm 10.7$  pg/ml, 대조군이  $355.0 \pm 52.6$  pg/ml, GBT 투여군이  $156.6 \pm 25.9$  pg/ml, 조인스정 투여군이  $140.6 \pm 16.3$  pg/ml로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였으며, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 6).



**Fig. 5.** Effects of GBT on the creatinine in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group. Control: MIA-induced osteoarthritis group. GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT. JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means  $\pm$  S.D.

##### 2) IL-6

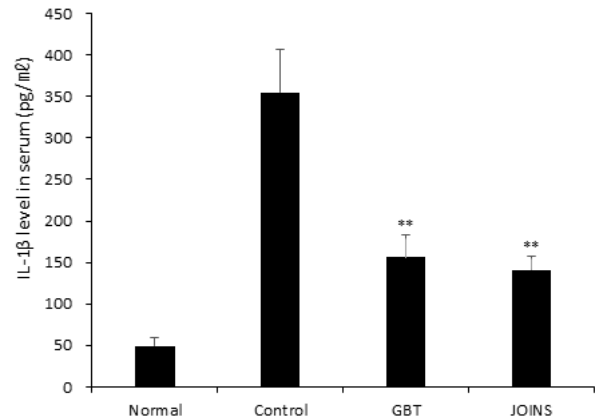
혈청 내 IL-6는 정상군이  $22.3 \pm 1.7$  pg/ml, 대조군이  $50.8 \pm 5.6$  pg/ml, GBT 투여군이  $33.9 \pm 4.6$  pg/ml, 조인스정 투여군이  $30.5 \pm 5.3$  pg/ml로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 7).

##### 3) TNF- $\alpha$

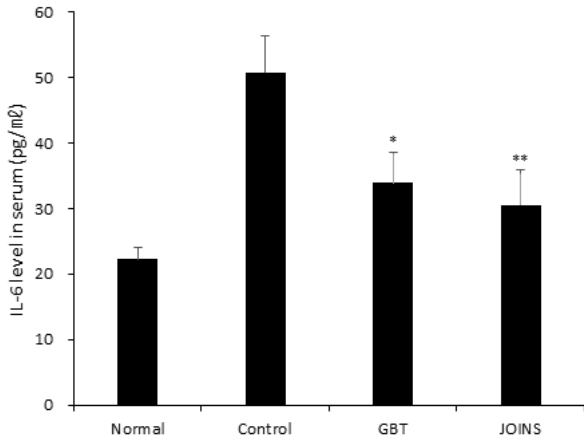
혈청 내 TNF- $\alpha$ 는 정상군이  $17.2 \pm 0.8$  pg/ml, 대조군이  $36.6 \pm 4.9$  pg/ml, GBT 투여군이  $27.7 \pm 2.8$  pg/ml, 조인스정 투여군이  $25.8 \pm 3.0$  pg/ml로 나타났다. GBT 투여군과 조인스정 투여군 모두 대조군에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 8).

##### 4) PGE $_2$

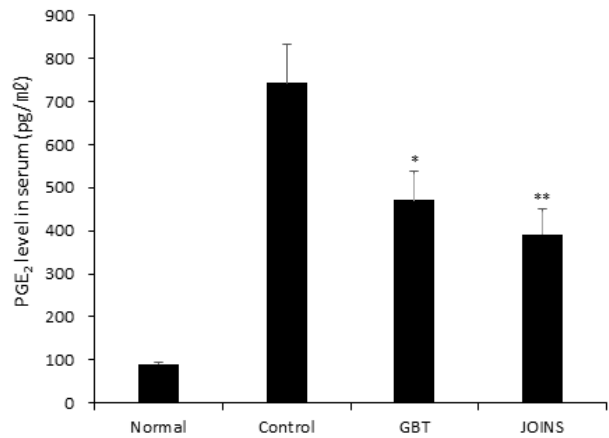
혈청 내 PGE $_2$ 는 정상군이  $90.0 \pm 5.7$  pg/ml, 대조군이  $743.0 \pm 88.1$  pg/ml, GBT 투여군이  $470.5 \pm 68.3$  pg/ml, 조인스정 투여군이  $392.5 \pm 59.1$  pg/ml로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.05$ ) 감소하였으며, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 9).



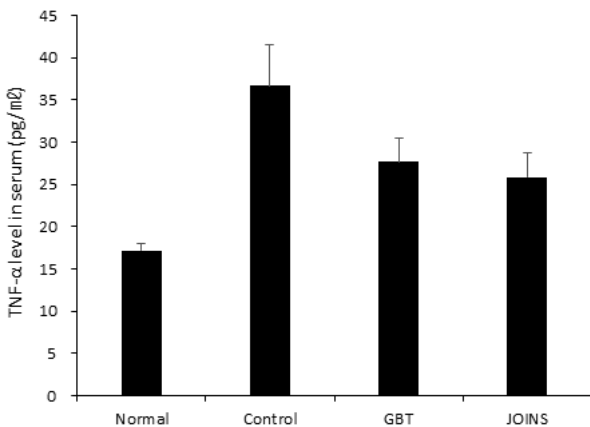
**Fig. 6.** Effects of GBT on levels of IL-1 $\beta$  in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group. Control: MIA-induced osteoarthritis group. GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT. JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means  $\pm$  S.D. Statistically significant value compared with control by t-test (\*\* $p < 0.01$ ).



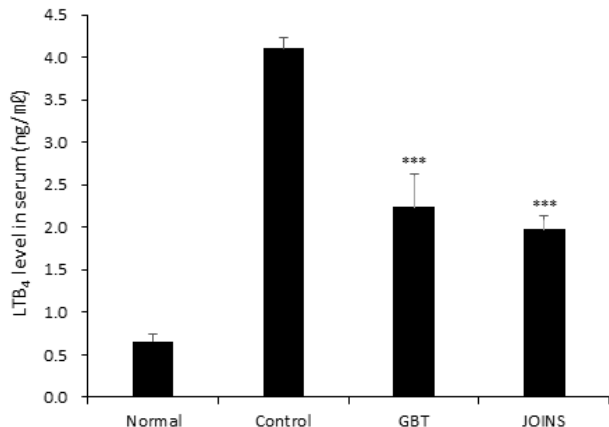
**Fig. 7.** Effects of GBT on levels of IL-6 in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means±S.D. Statistically significant value compared with control by t-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Fig. 9.** Effects of GBT on levels of PGE<sub>2</sub> in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means±S.D. Statistically significant value compared with control by t-test (\*p<0.05, \*\*p<0.01).



**Fig. 8.** Effects of GBT on levels of TNF-α in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet.



**Fig. 10.** Effects of GBT on levels of LTB<sub>4</sub> in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet. Value represent the means±S.D. Statistically significant value compared with control by t-test (\*\*\*p<0.001).

### 5) LTB<sub>4</sub>

혈청 내 LTB<sub>4</sub>는 정상군이 0.66±0.08 ng/ml, 대조군이 4.11±0.13 ng/ml, GBT 투여군이 2.24±0.39 ng/ml, 조인스정 투여군이 1.98±0.15 ng/ml로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 감소하였으며, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성 있게(p<

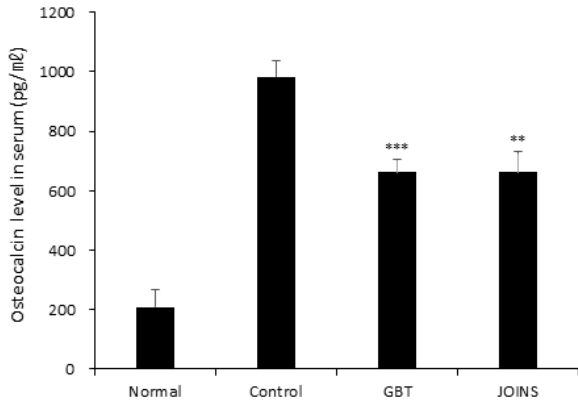
0.001) 감소하였다(Fig. 10).

### 6) Osteocalcin

혈청 내 Osteocalcin은 정상군이 209.1±57.3 pg/ml, 대조군이 983.7±52.7 pg/ml, GBT 투여군이 662.1±45.7

pg/ml, 조인스정 투여군이 662.2±70.0 pg/ml로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하였으며, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성

있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 11).

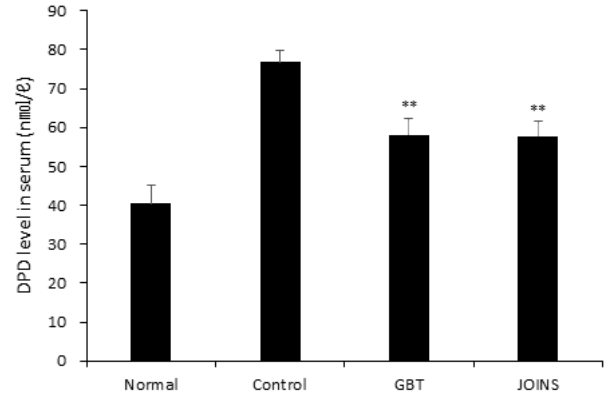


**Fig. 11.** Effects of GBT on levels of osteocalcin, in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet.

Value represent the means±S.D.

Statistically significant value compared with control by t-test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

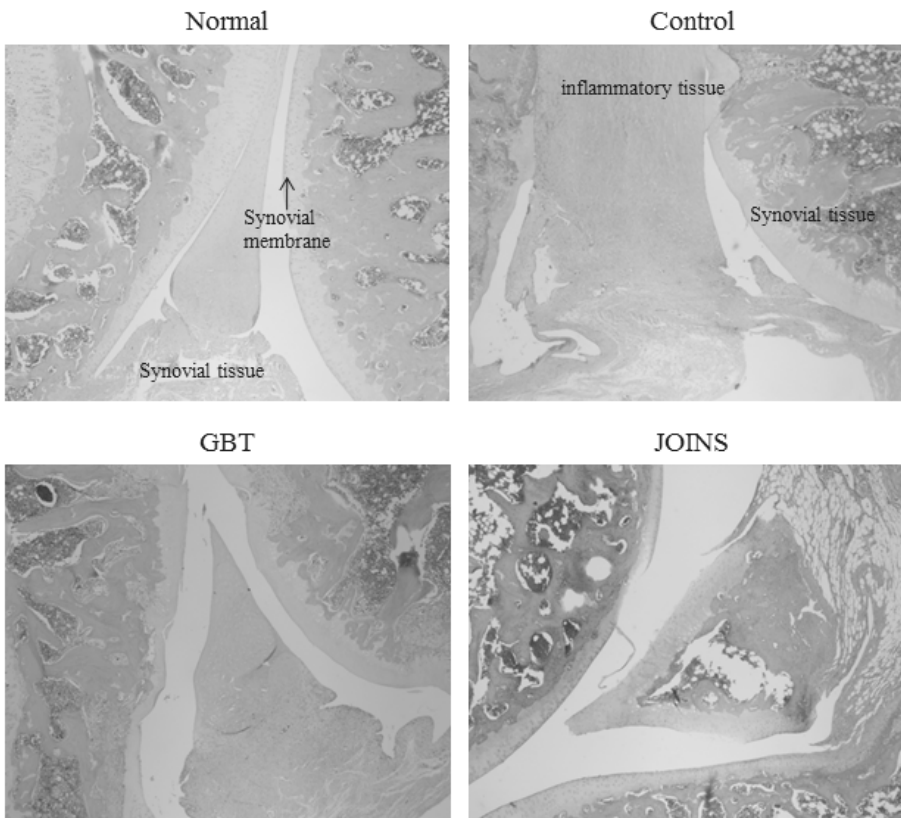


**Fig. 12.** Effects of GBT on levels of DPD in the serum of MIA-induced osteoarthritis rats.

Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet.

Value represent the means±S.D.

Statistically significant value compared with control by t-test (\*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 13.** Effect of GBT on joint pathology H&E staining from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats, Normal: SD rat normal group, Control: MIA-induced osteoarthritis group, GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT, JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet, →: synovial membrane.



7) DPD

혈청 내 DPD는 정상군이  $40.5 \pm 4.7$  nmol/l, 대조군이  $76.9 \pm 3.0$  nmol/l, GBT 투여군이  $58.0 \pm 4.4$  nmol/l, 조인스정 투여군이  $57.7 \pm 4.1$  nmol/l로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였으며, 조인스정 투여군도 대조군에 비해 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다(Fig. 12).

7. 병리조직학적 변화

1) H&E 염색

조직 염색 후 microscope를 이용하여  $1 \times 100$ 의 배율로 관찰한 결과 정상군의 관절은 활막 조직이 정상적으로 위치한 반면, 대조군은 관절 주변과 활막 세포의 과다 침투가 일어났으며 연골 활막 조직의 염증으로 인한 미란이 과다하게 발생한 것으로 나타났다. GBT 투여군은 대조군에 비해 활막의 염증이 상대적으로 적어 정상군과 비슷한 정도로 관찰되었고 조인스정 투여군도 대조군에 비해 상

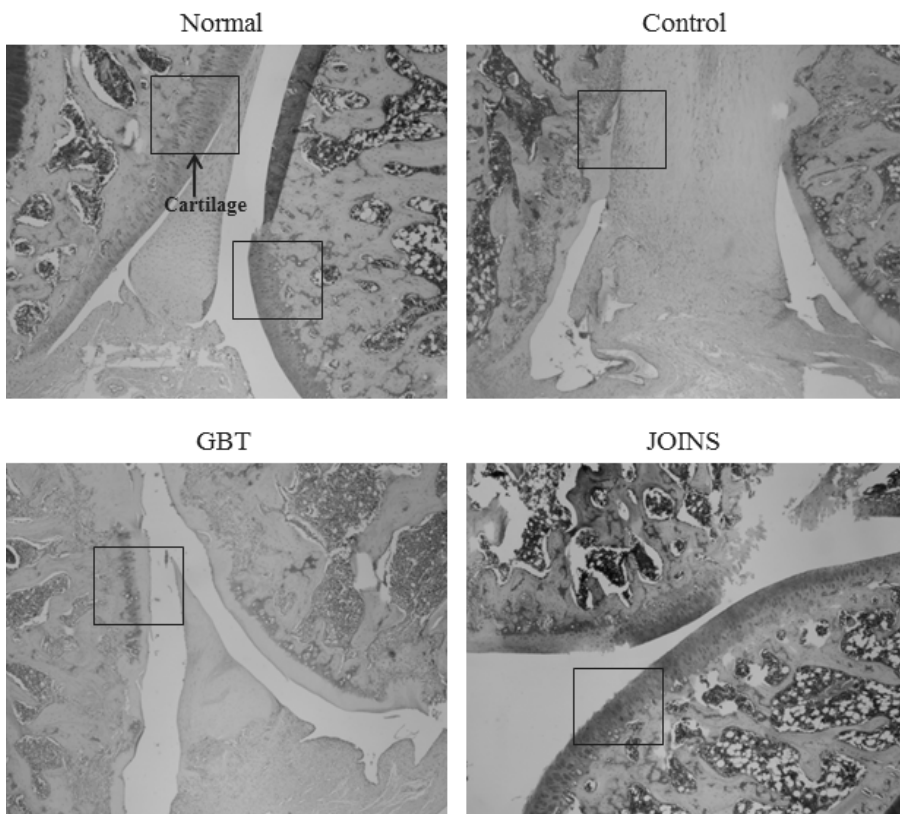
대적으로 활막의 손상이 적었다(Fig. 13).

2) Safranin-O 염색

조직 염색 후 microscope를 이용하여  $1 \times 100$ 의 배율로 관찰한 결과 정상군의 관절은 연골조직이 정상적으로 위치한 반면, 대조군은 관절 연골의 파괴가 나타나 붉게 염색된 proteoglycan 정상 조직이 거의 사라진 것을 관찰할 수 있었다. GBT 투여군은 관절면에서 연골의 파괴 정도가 대조군에 비해 적었고, 조인스정 투여군은 proteoglycan 조직이 정상군에 가깝게 유지되었다(Fig. 14).

고찰»»»»

골관절염은 국소 관절에 점진적인 관절연골 소실 및 그와 관련된 2차적인 변화와 증상을 동반하는 질환으로<sup>2)</sup>, 성인에서 관절통의 가장 흔한 원인이며 보행 및 일상생활 동작에 제한을 일으킨다<sup>14)</sup>. 2013년 국민건강통계에 의하면 연령별 골관절염 유병률은 남자의 경우 50대 2.1%, 60



**Fig. 14.** Effect of GBT on joint pathology Safranin-O staining from joint tissue of MIA-induced osteoarthritis rats. Normal: SD rat normal group. Control: MIA-induced osteoarthritis group. GBT: MIA-induced osteoarthritis group treated with GBT. JOINS: MIA-induced osteoarthritis group treated with Joins tablet, □: cartilage.

대 6.5%, 70세 이상 10.4%였고, 여자의 경우 50대 7.2%, 60대 20.8%, 70세 이상 36.1%로 연령이 높아질수록 유병률이 증가하고 있으며<sup>15)</sup>, 향후 노령화가 진행됨에 따라 골관절염 유병률이 더욱 증가할 것으로 예상된다.

최근 골관절염의 발병기전은 세단계의 과정으로 설명되고 있는데, 첫 번째는 여러 가지 기계적 자극이나 염증으로 인해 효소 반응, 대사 작용 등이 일어나고 이로써 연골의 손상이나 변화가 일어나는 단계로 설명되며, 두 번째는 조직의 손상과 변화를 연골세포가 감지하여 이화작용과 동화작용이 일어나는 단계로 설명된다. 마지막 세 번째는 손상 조직의 회복과 재형성이 실패하여 점차 관절 연골의 소실이 일어나고 연골세포의 동화작용과 증식반응이 감소되는 단계로 설명된다. 이러한 단계에서 이화작용에 관여하는 효소로 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 염증 상태의 관절막에서 다량 생성되어 염증 매개물질의 생성을 촉진하고 염증을 증폭시켜 골관절염의 진행을 유도한다<sup>16)</sup>.

한의학적으로 골관절염은痺症의 범주로 볼 수 있는데,痺는 閉의 뜻으로 風寒濕熱의 邪氣가 인체가 허약한 틈을 타고 經絡으로 침입하거나 관절에 응체됨으로써 氣血의 運行을 저해하여 肌肉, 筋骨, 關節에 麻木, 重着, 酸楚, 疼痛, 腫脹, 屈伸不利의 증상이 나타난다<sup>1)</sup>. 痺症은 병인 및 증상에 따라 行痺(風痺), 痛痺(寒痺), 着痺(濕痺), 熱痺, 瘀血痺, 虛痺 등으로 분류하는데, 골관절염은 통증이 가장 대표적인 임상증상으로 痛痺(寒痺)에 속하며 만성, 퇴행성 질환의 병리로 보아 虛痺에 속한다고 할 수 있다. 따라서, 골관절염의 치료는 溫補하는 동시에 氣血不通하여 나타나는 통증을 宣通하는 치법을 사용해야 한다<sup>1)</sup>.

본 연구에서 사용된 桂枝加附子湯은 「傷寒論」에 기록된 桂枝, 芍藥, 附子, 生薑, 大棗, 甘草로 구성된 처방으로, “太陽病 發汗 遂漏不止 其人惡風 小便難 四肢微急 難以屈伸者 桂枝加附子湯主之”라 하여 桂枝湯證에 과도한 發汗으로 인하여 惡寒을 호소하고 四肢筋肉이 당겨서 屈伸이 곤란하고 小便難하여 快通하지 못한 자를 치료하는 것으로 기록되어 있다<sup>9)</sup>.

桂枝는 發散風寒藥으로 味는 辛甘하고 性은 溫하여 肌表의 風寒을 發散하며 四肢에 橫走하여 經脈을 宣通케 하며 關節을 利하는 효능이 있다<sup>17)</sup>. 桂枝 약침액이 IL-4, TNF- $\alpha$ 의 작용을 저해하여 알레르기성 염증 반응을 억제한다는 연구<sup>18)</sup>가 있었으며, 桂枝 추출물이 PGE<sub>2</sub> 활성을 저해하고 COX-2 발현을 감소시켜 항염증 효과를 나타낸다는

연구<sup>19)</sup>가 있었다.

芍藥은 補血藥으로 味는 苦酸하고 性은 微寒하여 養血 斂陰하고 柔肝止痛하며 平肝抑陽하는 효능이 있어 諸痛을 치료한다<sup>17)</sup>. 芍藥이 정상 간세포의 산화적 손상을 저해하고 세포 보호 작용을 나타낸다는 연구<sup>20)</sup>가 있었으며 芍藥 약침액의 항산화 효과에 대한 연구<sup>21)</sup>가 있었다.

附子는 溫理藥으로 味는 辛甘하고 性은 熱하여 回陽 復脈하고 腎陽不足으로 陽萎滑精하고 腰膝冷弱한 것을 치료하는 효능이 있다<sup>17)</sup>. 附子が IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 변화에 영향을 미쳐, 다양한 면역 또는 염증반응을 억제한다는 연구<sup>22)</sup>가 있었으며, IgG, IgM, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 를 억제시켜 관절염에 유의한 효과를 나타낸다는 연구<sup>23)</sup>가 있었다.

生薑은 發散風寒藥으로 味는 辛하고 性은 溫하여 風寒의 邪氣를 散하며 脾胃經에 들어가 溫中和脾시키며 解毒하는 효능이 있다<sup>17)</sup>. 生薑의 섭취를 통하여 면역세포, 특히 비장세포의 증식과 대식세포의 활성화를 유도함으로써 면역기능이 증강된다는 연구<sup>24)</sup>가 있었으며, 生薑 클로로포름 분획이 염증 cytokine과 매개체들의 활성을 저해하여 항염증 작용을 한다는 연구<sup>25)</sup>가 있었다.

大棗은 補氣藥으로 味는 甘하고 性은 溫하여 補脾和胃하고 益氣生津하며 養心安神한다. 大棗는 대개 生薑과 같이 配合되는데 大棗의 甘味와 生薑의 辛味가 배합됨으로써 榮衛를 조화시켜 준다<sup>17)</sup>. 大棗의 피부 염증에 대한 항염증작용 연구<sup>26)</sup>가 있었고, 항산화 및 항암작용에 대한 연구<sup>27)</sup>가 있었다.

甘草는 補氣藥에 속하며 味는 甘하고 性은 平하여 緩急止痛 하는 효능이 있어 四肢攣急作痛을 치료하며, 諸藥을 調和하는 효능이 있어 여러 방제에서 補助劑, 緩和劑로 사용된다<sup>17)</sup>. 甘草가 염증 cytokine의 활성을 저해한다는 연구<sup>28)</sup>가 있었으며, 甘草 추출물의 항산화 작용과 안정성에 대한 연구<sup>29)</sup>가 있었다.

이처럼 桂枝加附子湯을 구성하는 각각의 약재는 면역증강효능, 항산화효능, 항염증효능, 진통효능을 갖고 있는데, 각 약재가 서로 배합되면 그 기능이 조화를 이루고 더욱 우수한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료되었다. 또한 桂枝加附子湯은 실험동물에서 鎮痛, 鎮痙 효과를 보였다는 연구<sup>12)</sup>가 보고되어 있어 주증상이 통증인 골관절염에 효과가 있을 것으로 생각하였다. 이에 MIA 유도 골관절염 Rat 모델에 대하여 실험을 실시하였으며 桂枝加附

子湯이 골관절염 치료제로서의 가능성을 찾을 수 있었다.

MIA 유발 골관절염 동물모델은 Kalbhen and Blum에 의해서 최초로 확립되었다<sup>30)</sup>. MIA를 관절강 내 주입하면 관절 연골의 변성 및 괴사가 진행되는데, 연골의 손상과 기능 장애, 통증 등의 양상이 사람의 골관절염과 매우 유사하게 발생되어 골관절염과 관련된 많은 연구에 응용되고 있다<sup>4,31)</sup>.

먼저, 桂枝加附子湯의 안정성에 대하여 알아보기 위해 혈청 AST, ALT, Creatinine을 측정하고 체중 변화와 식이 효율을 측정하였다.

AST, ALT 및 Creatinine은 간과 신장 기능을 반영하는 중요한 인자들로, 본 연구에서 AST, Creatinine 수치는 GBT 투여군이 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으며 ALT 수치는 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4, 5). 그러나 GBT 투여군의 ALT는 Rat의 정상범위 안에 있어<sup>32)</sup> 간 독성이 나타났다고 보기는 어렵다. 또한 체중 변화량과 식이효율을 측정한 결과에서 각 군 간에 유의할 만한 변화는 관찰되지 않았는데(Fig. 1, 2), 이는 실험동물의 식이에 영향을 줄 만한 부작용이 나타나지 않았음을 시사한다. 이를 종합해 볼 때 桂枝加附子湯이 생체 내에서 안정성이 있는 약물임을 확인할 수 있었다.

桂枝加附子湯의 골관절염의 치료제로서 유효성을 확인하고자 뒷다리 체중 부하 검사를 통해 통증 억제 효과를 확인하였고, 골관절염의 병리기전에 관여하는 혈청 내 염증 cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )과 매개인자인 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin, DPD를 측정하였으며, H&E 및 Safranin-O 염색을 통해 관절의 병리조직학적 검사를 시행하여 관절막과 연골의 손상 정도를 확인하였다.

체중 부하 검사는 관절염이 유발된 다리 쪽으로 체중을 신지 않으려는 특성을 이용하여 체중 부하 정도를 측정하는 검사로<sup>33)</sup>, 본 연구에서 골관절염이 유발된 Rat의 통증 변화를 확인하기 위해 사용되었다. GBT 투여군은 대조군과 비교하여 뚜렷한 통증 감소를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 3).

IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 활성화된 대식세포로부터 생성되는 주요 cytokine으로 염증 반응을 매개하는데<sup>34)</sup>, IL-1 $\beta$ 는 T세포에 대해 lymphokine의 생산을 촉진시키고 B세포를 자극하여 항체의 생산을 증가시키고 염증 반응을 일으키는데 중요한 역할을 하고<sup>35)</sup>, IL-6는 항암효과와 간세포의 단백질 합성을 유도하고 조직 손상에 대한 발열

반응을 초래하며 흥선 세포와 T세포의 분화에 관여하며<sup>36,37)</sup>, TNF- $\alpha$ 는 면역반응을 증가시키고 혈관 성장 자극, 감염, 염증과 창상 치유의 촉진과 종양의 항증식작용을 한다<sup>38)</sup>.

본 실험에서 혈청 내 cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정된 결과, GBT 투여군이 대조군에 비해 IL-1 $\beta$ , IL-6가 유의성 있게 감소하였으며, TNF- $\alpha$ 는 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6-8). 이는 桂枝加附子湯이 염증 cytokine의 생성을 억제하여 항염증 효과가 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다.

PGE<sub>2</sub>는 염증반응의 중요한 매개물질로 다양한 염증성 질환에서 정상 조직의 파괴와 함께 생성이 촉진되는 것으로 알려져 있으며, 골관절염에서 염증을 매개하여 관절부위 통증, 국소종창 및 발열 등의 증상을 야기한다<sup>39,40)</sup>.

LTB<sub>4</sub>는 lipoygenase의 활성화에 따른 주요 산물로서 염증 반응에서 호산구 및 호중구에 대하여 강력한 유주성 특성을 갖는 성분으로 알려져 있으며, 세포의 화학주성에 필요한 여러 인자들과 세포부착인자의 발현에 영향을 주어 치주염, 류마티스 관절염 및 다수의 염증성 질환에 핵심적 기능을 하는 인자이다<sup>41)</sup>.

Osteocalcin은 뼈의 성장, 변형, 재생에 중요한 역할을 하는 조골세포에서 합성되는 골대사 지표 단백질이다<sup>42)</sup>. 골관절염은 연골하골의 침하, 골극 형성, 연골하골의 경화 등 신생골 형성을 특징으로 하는 질환 특성상 골 교체가 증가하여 골아세포의 작용이 촉진되는데, 이런 이유로 골관절염에서는 Osteocalcin의 혈청 내 농도가 높아질 수 있다<sup>43)</sup>.

DPD는 파골세포에 의해 콜라겐이 분해되면서 혈액 내로 유리되는데, 특이도가 높으며 대사되지 않고 그대로 소변으로 배설되어 골관절에서 골용해를 반영하는 지표이다<sup>44)</sup>.

본 연구에서 염증 매개인자인 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin, DPD의 생성량을 측정된 결과, 모든 지표에서 GBT 투여군이 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보여(Fig. 9-12) 桂枝加附子湯이 염증 매개인자들의 생성을 억제하여 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

골관절염의 병리조직학적 평가를 위해 실험 종료 후 채취한 관절 조직 절편을 H&E, Safranin-O 염색을 통해 관찰한 결과, GBT 투여군에서 관절 활막의 염증 조직과 섬유화 정도가 대조군에 비해 상대적으로 감소되었고, 관절절을 보호하는 proteoglycan 층의 손상이 대조군에 비

해 적었다(Fig. 13, 14).

본 연구에서 양성대조군에 투여한 조인스정은 대표적인 골관절염 치료 약물로 한약재인 威靈仙, 瓜蒌根, 夏枯草의 에탄올 30% 추출 제제로<sup>45)</sup>, 활성 산소에 의해 연골의 collagen 및 proteoglycan이 파괴되는 것을 억제하는 기전으로 작용하는 골관절염 치료제이다<sup>46)</sup>. 조인스정은 한약재 유래 물질로서 한약인 桂枝加附子湯의 효과를 비교하기에 적합할 것으로 사료되어 양성대조군 약물로 사용하였다.

桂枝加附子湯과 조인스정의 실험 결과를 비교해보았을 때, 뒷다리 체중 부하 검사 상 GBT 투여군이 114.3±12.3%, 조인스정 투여군이 120.5±8.2%로 나타났고, 통계적 유의성은 없었으나 GBT 투여군과 조인스정 투여군이 비슷한 정도의 통증 억제 효과를 보였다(Fig. 3).

혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정 결과 상 IL-1β는 GBT 투여군이 156.6±25.9 pg/ml (p<0.01), 조인스정 투여군이 140.6±16.3 pg/ml (p<0.01)로 감소하였고(Fig. 6), IL-6는 GBT 투여군이 33.9±4.6 pg/ml (p<0.05), 조인스정 투여군이 30.5±5.3 pg/ml (p<0.01)로 감소하였으며(Fig. 7), TNF-α는 GBT 투여군이 27.7±2.8 pg/ml, 조인스정 투여군이 25.8±3.0 pg/ml 감소하였다(Fig. 8). PGE<sub>2</sub>는 GBT 투여군이 470.5±68.3 pg/ml (p<0.05), 조인스정 투여군이 392.5±59.1 pg/ml (p<0.01)로 감소하였고(Fig. 9), LTB<sub>4</sub>는 GBT 투여군이 2.24±0.39 ng/ml (p<0.001), 조인스정 투여군이 1.98±0.15 ng/ml (p<0.001)로 감소하였다(Fig. 10). Osteocalcin은 GBT 투여군이 662.1±45.7 pg/ml (p<0.001), 조인스정 투여군이 662.2±70.0 pg/ml (p<0.01)로 감소하였고(Fig. 11), DPD는 GBT 투여군이 58.0±4.4 nmol/l (p<0.01), 조인스정 투여군이 57.7±4.1 nmol/l (p<0.01)로 감소하였다(Fig. 12). 이를 종합하면 GBT 투여군은 조인스정 투여군과 비슷한 정도로 염증 지표들의 생성을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

H&E, Safranin-O 염색을 통한 병리조직학적 검사 상 GBT 투여군과 조인스정 투여군 모두 관절막과 연골의 손상 정도가 대조군에 비해 적었는데, GBT 투여군은 H&E 염색에서 관절막이 정상군에 가깝게 보존되었고, 조인스정 투여군은 Safranin-O 염색에서 연골이 정상군에 가깝게 보존되었다(Fig. 13, 14).

위 결과들을 종합해볼 때 골관절염을 억제하는 효능에

있어서 桂枝加附子湯은 조인스정과 그 정도가 비슷하다고 볼 수 있다. 桂枝加附子湯은 300 mg/kg, 조인스정은 25 mg/kg으로 투여용량이 동일하지 않아 정확한 비교는 아니라는 점에서 결과가 제한적이지만 추후 추가적인 연구를 기대해 볼 수 있다.

## 결론»»»»

桂枝加附子湯이 골관절염에 미치는 효과를 확인하기 위해 MIA로 유도된 골관절염 Rat를 이용하여 뒷다리 체중 부하 검사, 혈청 내 염증 cytokine 및 매개인자 측정, 무릎 관절의 병리조직학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간독성 및 신독성은 나타나지 않았다.
  2. 뒷다리 체중 부하 검사에서 뚜렷한 통증 감소가 나타났다.
  3. 혈청 내 염증 cytokine 중 IL-1β, IL-6는 유의성 있게 감소하였으며, TNF-α는 감소하였으나 유의성은 없었다.
  4. 혈청 내 염증 매개인자 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin, DPD가 유의성 있게 감소하였다.
  5. 병리조직학적 소견에서 무릎 관절의 관절막의 미란, 염증조직 등이 감소하였고 연골의 손상이 감소하였다.
- 이상의 결과를 종합하면 桂枝加附子湯이 MIA로 유도된 골관절염 Rat에서 통증을 감소시키고 혈청 내 염증 cytokine 및 PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, Osteocalcin, DPD 등 매개인자의 생성을 억제하여 항염증 작용을 하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 병리조직학적 관찰을 통해 관절막의 손상과 연골의 파괴를 억제하는데 효과가 있음을 확인하였다. 이를 통해 桂枝加附子湯이 골관절염 치료에 효과가 있을 것으로 사료되며 향후 임상에서의 활용을 기대할 수 있을 것이다.

## References»»»»

1. 한방재활의과학회. 한방재활의학. 제3판. 서울:군자출판사. 2011:84-98.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 제6판. 서울:최신의학사. 2006:253-61.
3. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Bruce CB & van den Berg WB. The role of synovial macro-

- phages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):647-57.
4. Combe R, Bramwell S, Field MJ. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis. *Neurosci Lett.* 2004;370(2-3):236-40.
  5. 이은정, 오민석. 健步丹이 MIA로 유도된 골관절염 Rat에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2014;24(2):51-64.
  6. 김대훈, 강성인, 송민영, 최진봉, 배길준, 한정석, 양미성, 신용진. 방기황기탕이 Monosodium Iodoacetate로 유발된 흰쥐의 골관절염에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2014;24(2):15-29.
  7. 안순선, 허동석. 桂枝人蔘湯이 MIA로 유도된 골관절염 유발 Rat에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 2013;34(3):69-85.
  8. 김대형, 정수현, 서일복, 김순중. 疎風活血湯이 Monosodium Iodoacetate로 유발한 흰쥐의 골관절염 억제에 미치는 영향. *한방재활의학과학회지.* 2011;21(1):57-77.
  9. 이승인. 新古方撰次. 서울:군자출판사. 2012:37.
  10. 김진우, 박강인, 박경선, 이진무. 양측난소절제술 후 발생한 汗出過多를 주스로 하는 갱년기증후군 환자에 대한 桂枝加附子湯 치료 1례. *대한한방부인과학회지* 2013;26(4):213-22.
  11. 방정균. 桂枝加附子湯證에 대한 考察. *대한한의학회지* 2006;19(2):53-9.
  12. 안병룡. 桂枝加附子湯 전탕액이 실험동물의 진통, 진경 및 혈관에 미치는 영향. *원광대학교 석사학위논문.* 1995.
  13. 식품의약품안전처. 생약(한약)제제의 효력시험 가이드라인-골관절염. Available URL from: [http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=1161&searchkey=notice\\_number&searchword=B1-2009-3-017&x=0&y=0](http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=1161&searchkey=notice_number&searchword=B1-2009-3-017&x=0&y=0).
  14. 한태륜, 방문석 외 57인. *재활의학*. 제3판. 서울:군자출판사. 2009:905-35.
  15. 국민건강영양조사. 2013 국민건강통계. Available from: <http://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/index.do>.
  16. Abbas AK, Lichtman AH. *세포분자면역학*. 서울:법문사. 2004:243-88.
  17. 전국한의과대학 본초학 공동교재편찬위원회. *본초학*. 서울:영림사. 2007:154-5, 171-2, 372-4, 583-6, 634-5.
  18. 김동훈, 송춘호. 桂枝藥鍼이 Type 1 Hypersensitivity에 미치는 영향. *대한경락경혈학회지.* 2009;26(1):125-37.
  19. 박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모, 최일환, 김수영, 심범상, 이재현, 임사비나. 계지의 항염 효과에 관한 연구. *대한한의학회지.* 2005;26(2):140-51.
  20. 문진영. 작약 약침액이 tert-butyl hydroperoxide로 유도된 흰쥐 배양 간세포의 지질과산화반응 및 항산화효소 활성에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2000;17(3):176-87.
  21. 임창수, 김갑성. 芍藥 藥鍼의 抗酸化 效能에 미치는 影響. *대한침구학회지.* 1999;16(3):269-86.
  22. 고동균, 윤정문, 이태희. 附子가 Lipopolysaccharide의 뇌실 주입으로 유발된 생쥐의 혈중 IL-6와 TNF- $\alpha$  변화에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2004;12(1):195-208.
  23. 김윤희, 임윤경, 이현. 附子藥鍼이 흰쥐의 Collagen 유발 관절염에 미치는 영향. *대한경락경혈학회지.* 2006;23(2):137-54.
  24. 류혜숙, 김진, 박상철, 김현숙. 생강추출물투여에 의한 마우스 비장세포 및 대식세포 활성효과. *한국영양학회지.* 2004;37(9):780-5.
  25. 서운교, 정효원, 박용기. 생강 클로로포름 분획의 활성화된 腦神經膠細胞에서 염증반응 억제효과. *대한본초학회지.* 2008;23(3):73-83.
  26. Al-Reza SM, Yoon JI, Kim HJ, Kim JS, Kang SC. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food and Chemical Toxicology.* 2010;48:639-43.
  27. 김예진. 추출용매에 따른 건대추 과육, 씨, 잎 추출물의 항산화 및 항암효과. *대구한의대학교 석사학위논문.* 2010.
  28. 송상진, 배한호, 박양춘. 감초가 천식모델 생쥐의 plasma내 histamine과 폐조직내 cytokine 생성에 미치는 효과. *동의생리병리학회지.* 2004;18(3):841-5.
  29. 김수정, 권대혁, 이종화. 감초의 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 안정성 조사. *한국식품과학회지.* 2006;38(4):584-8.
  30. Kalben DA, Blum U. Theoretisches Konzept und experimentelle bestatigung fur ein neues arthros modell amversuchstier. *Arzneimittelforschung Drug Res.* 1977;27:527-31.
  31. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic change of rat femorotibial joints : an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol.* 2003;31(6):619-24.
  32. 권영일 외 공저. *실험 동물 임상병리학*. 서울:아카데미아. 2009:42, 185.
  33. Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. Weight bearing as a measurement of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage.* 2003;11:821-30.
  34. Meydani SN. Dietary modulation of cytokine proproduction and biologic functions. *Nutr Rev.* 1990;48:361-9.
  35. Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:151-60.
  36. Liu M, Li J, Kong F, Lin J, Gao Y. Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology.* 1998;40:187-98.
  37. Dinarello CA, Endres S, Meydani SN, Meydani M, Hellerstein MK. Interleukin-1, anorexia, and dietary fatty acids. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;587:332-8.
  38. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol.* 1987;135:2492-7.
  39. Kontny E, Rudnicka W, Kowalczewski J, Marcinkiewicz J, Maslinski W. Selective inhibition of cyclooxygenase 2-generated prostaglandin E2 synthesis in rheumatoid ar-

- thrititis synoviocytes by taurine chloramine. *Arthritis and Rheumatism*, 2003;48(6):1551-5.
40. Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*. 2008;14(10):461-9.
41. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B<sub>4</sub>: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385(2):231-41.
42. 이용환, 박원, 김성수, 박보형, 송정수. 류마티스 관절염 환자에서 저용량 스테로이드 용법이 골대사에 미치는 영향. *대한류마티스학회지*. 2003;10(3):293-9.
43. 박준섭, 주영실, 최윤선, 정명아, 하형근, 정인수, 김시민, 김병준, 안규정, 최영길. 척추 골관절염 환자에서의 골밀도와 골다공증성 척추골절의 빈도와의 관계. *대한류마티스학회지*. 2003;10(1):45-52.
44. Rubinacci A1, Melzi R, Zampino M, Soldarini A, Villa I. Total and free deoxyypyridinoline after acute osteoclast activity inhibition. *Clin Chem*. 1999;45(9):1510-6.
45. 약품 검색 인터넷 서비스. *드러그인포*. Available URL from: <http://www.druginfo.co.kr/search2/search.aspx?q=joins>.
46. 송은규, 윤택림, 김재휴, 이삼규. 슬관절 골관절염 환자에서 조인스정의 유효성 및 안정성. *최신의학*. 2002;45(9-10):121-7.